



TITLE:

Studies on symbiosis-specific phenotype of
Mesorhizobium loti and its function to host
plant(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tatsukami, Yohei

CITATION:

Tatsukami, Yohei. Studies on symbiosis-specific phenotype of Mesorhizobium loti and its function to host plant. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20438>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	立上陽平
論文題目	Studies on symbiosis-specific phenotype of <i>Mesorhizobium loti</i> and its function to host plant (ミヤコグサ根粒菌の共生特異的な表現型と宿主への影響に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>根粒菌は、マメ科植物と共生し、根粒を形成する微生物である。根粒菌は根粒の中で宿主から光合成産物やその他栄養素の供給を受け、そのエネルギーを用いて窒素固定を行い、宿主に窒素源を供給する。根粒菌は植物と複雑な相互作用を行いながら感染し、根粒内でバクテロイドと呼ばれる窒素固定形態に分化するが、その明確な機構や生態については概ね未知である。本研究ではミヤコグサ根粒菌 <i>Mesorhizobium loti</i> を対象に、その根粒内での生態を調べることを目的として研究を行った。</p>			
1. 共生状態と free-living 状態の比較プロテオーム解析			
<p><i>M. loti</i> の共生状態と free-living 状態のそれぞれの生態の違いは生理学的に非常に興味深い。そこで、宿主ミヤコグサ <i>Lotus japonicus</i> との共生状態にある <i>M. loti</i> と、free-living 条件下の <i>M. loti</i> の菌体内のプロテオーム解析を行うことで、両者のタンパク質の変動を網羅的に解析することを試みた。</p> <p>まず、モノリスカラム (200 cm) を用いた nanoLC-MS/MS により、共生状態の根粒菌にプロテオーム解析を適用できる分析系を構築した。分析の結果、共生状態の根粒菌から847種類、free-living 状態の根粒菌から 1,533 種類のタンパク質を同定した。KEGG によるパスウェイ解析の結果、<i>M. loti</i> は free-living 状態のみで、鞭毛や線毛の構成タンパク質、細胞壁合成に関わる酵素や細胞外分泌多糖を合成する酵素を生産し、free-living 状態と共生状態で根粒菌の細胞表層に大きな違いがあることが示唆された。一方、共生状態でのみ、窒素固定に関わるタンパク質やフェレドキシンなど電子伝達系に関わるタンパク質が生産されていた。さらに、テルペノイドの生合成に関わるタンパク質群も共生状態でのみ検出された。従って、<i>M. loti</i> が根粒内において二次代謝産物などに代表されるテルペノイドを合成し、宿主に供給しているということが示唆された。</p>			
2. 根粒形成過程における時系列プロテオーム解析			
<p>根粒菌が植物との共生関係の成熟過程でどのようにタンパク質発現を変化させているかは興味深い。そこで、根粒菌の根粒形成過程における菌体内環境の変遷を理解するために、バクテロイド分化過程におけるタンパク質の定量的な変動を解析した。</p> <p><i>L. japonicus</i> に <i>M. loti</i> を感染させ、2、3、4週間後に採取した根粒からバクテロイドを単離・精製し、共生状態の試料とした。各試料からタンパク質を抽出し、トリプシンで加水分解後、調製したペプチド溶液を定量プロテオーム解析に供した。結果として、537種類のタンパク質を同定・定量した。多変量解析を行ったところ、特に窒素代謝を制御するタンパク質 GlnK (mll4247) 及びグルタミン酸シンターゼ (GOGAT; mll1646) が感染 2 週間後の <i>M. loti</i> で有意に増加することが判明した。GlnK と GOGAT は、窒素欠乏状態において発現が上昇することが知られているため、感染初期の根粒において、<i>M. loti</i> は窒素欠乏状態に陥ることが推測された。一方、感染 4 週間後の <i>M. loti</i> では、GlnK と GOGAT の発現量は free-living と同程度まで減少し、窒素が豊富な条件下において発現が上昇するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) の発現が有意に増加した。これらの結果から、根粒形成初期には窒素欠乏状態に陥ることで、根粒菌は窒素固定に関与するタンパク質の発現を増加させて窒素固定を行うことが推測された。一方、根粒形成後期には窒素が豊富な条件下にあり、根粒菌は窒素固定に関与するタンパク質の発現を減少させて窒素固定を抑制していることが推測された。</p>			

H; mll4104) の発現が有意に上昇していた。これらの結果から、成熟根粒において、*M. loti* は窒素が豊富な状態にあることが推測された。従来の研究では、根粒菌は共生下でアンモニアを自らは同化せず、植物に供給していると考えられていたが、プロテオーム解析の結果、アンモニアの同化に必要な酵素である GDH 及び グルタミンシンターゼ I (mll0343) の発現が感染 4 週間後の根粒菌において大きく上昇していた。この結果より、根粒菌は共生状態において自らアンモニアを同化し、アミノ酸を合成している可能性が推察された。

3. テルペノイド生合成遺伝子の機能解明

比較プロテオーム解析により見出されたテルペノイド合成オペロンについて解析を行った。*M. loti* ゲノム上の目的のオペロンを誘導発現できる株を構築し、メタボローム解析を行った結果、オペロンの産物が植物ホルモンであるジベレリン A₉ (GA₉) 及び A₂₄ (GA₂₄) と同定された。さらに、オペロンに含まれる 8 つの酵素遺伝子が大腸菌に発現させ機能解析をした結果、*M. loti* がこれらの 8 酵素を用いて、テルペノイド合成の出発物質であるイソペンテニルニリン酸から GA₉ を合成することを明らかにした。これは、バクテリアにおけるジベレリン合成経路を決定した初めての例である。

この共生状態特異的な根粒菌の植物ホルモン合成の機能を解明するために、ジベレリン合成遺伝子に変異が入った STM 変異株 (*gib*⁻) を、野生株とともに植物に接種し、接種後 8 週間まで表現型を比較した。その結果、*gib*⁻ 株を感染させた宿主と野生株を感染させた宿主で生育の変化は見られなかったが、*gib*⁻ 株を感染させた宿主において、接種後 4 週間から根粒数が有意に増加し、根粒あたりの窒素固定活性が有意に減少することが判明した。さらに、*gib*⁻ 株を接種した宿主にジベレリン (GA) を添加することで根粒数は野生株同様に制御された。これらの結果から、根粒菌は GA を生産することにより、根粒数を最適な数に調節し、窒素固定活性を最大化することが判明した。さらに、根粒菌由来のジベレリンが宿主の NSP2 (Nodule Signaling Pathway) 遺伝子を抑制することで根粒形成を抑制することが推察された。

様々な種の根粒菌間でのジベレリン合成オペロンの分布を調べるため、ジベレリン合成の鍵酵素の遺伝子である *ent-copalyl pyrophosphate synthase* (mlr6369) と *ent-kaurene synthase* (mlr6370) について相同性検索を行った。その結果、ジベレリン合成オペロンを持つ種と持たない種に分類されることが判明した。興味深いことに、有限根粒 (determinate nodule) を形成するマメ科宿主と共生する根粒菌である *M. loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium etli* などはジベレリン合成オペロンを持っており、無限根粒 (indeterminate nodule) を形成する共生根粒菌である *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* などはジベレリン合成オペロンを持たないことが判明した。これは、根粒の形態と根粒菌のジベレリン合成に強い相関があることを示唆している。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 38 字×36 行で作成し、合わせて、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 500～2,000 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

マメ科—根粒菌の共生関係において、これまであまり解明されていなかった共生中の根粒菌の生態に着目し、共生状態に特徴的な因子の検出とその生理機能の解明を行った。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. *M. loti* の共生状態と free-living 状態の違いの解明

2つの状態間の根粒菌の違いをプロテオーム解析で比較したところ、特に細胞形態や細胞表層に関わる変化が判明した。これらの違いは従来の遺伝学的解析や観察では捉え難く、プロテオーム解析を適用することで判明した新規な現象である。更に、テルペノイド合成に関わる新規遺伝子群も同定した。

2. *M. loti* の共生状態への適応過程における窒素代謝変動の解明

根粒形成過程における *M. loti* の時系列定量プロテオーム解析により、*M. loti* が共生過程において窒素代謝を変動させていることを明らかにした。この結果は、従来の研究における推測とは異なり、*M. loti* が共生初期に一度窒素欠乏状態に陥ること、成熟根粒内では *M. loti* が活発にアンモニアを同化し、アミノ酸合成を行っていることを明らかにした。これらの事実はタンパク質発現の定量的な情報を得ることにより初めて解明された。

3. バクテリアにおけるジベレリン合成経路の解明

比較プロテオーム解析により発見されたテルペノイド合成オペロンの機能解析により、根粒菌が共生状態でジベレリン A₉ を合成することを発見した。さらに大腸菌に発現させた酵素遺伝子の機能解明により、*M. loti* におけるジベレリン合成経路を解明した。バクテリアにおいてジベレリン合成遺伝子群と合成経路の報告の例は無く、初めての発見である。

4. 根粒菌が共生時に宿主の根粒数調節を主導する現象の発見

M. loti のジベレリン合成による宿主表現型への影響を調べた結果、宿主の根粒数を抑制する機能があることを解明した。この制御により *M. loti* がジベレリン合成により根粒内の生育と窒素固定能を最適化していた。さらに、根粒菌のジベレリン合成遺伝子の分布をマッピングすることにより、宿主の根粒型とジベレリン合成に強い相関があることも明らかにし、ジベレリン合成遺伝子と宿主表現型の共進化の可能性を示唆した。

以上のように、本論文は、*M. loti* の共生状態における生態をプロテオーム解析により調べ、さらに、マメ科—根粒菌共生関係における新規な根粒数調節機構を初めて明らかにした。これにより、本共生関係の理解の深化に貢献すると考えられる。さらに、将来的に農作物の効率的な生産に応用できる可能性も考えられた。これらの結果は、生体高分子化学、環境微生物学、共生微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）